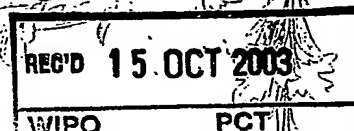


T/KR 03/02034

RO/KR 07.10.2003

#2



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0061994
Application Number

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

출원 년 월 일 : 2002년 10월 11일
Date of Application OCT 11, 2002

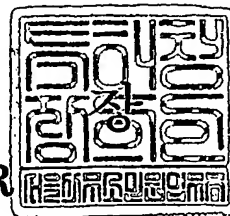
출원인 : (주) 비엔씨바이오팜
Applicant(s) B.N.C BIO PARM CO., LTD.



2003 년 09 월 29 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】

명세서 등 보정서

【수신처】

특허청장

【제출일자】

2003.02.19

【제출인】

【명칭】

(주)비엔씨바이오팜

【출원인코드】

1-2000-046587-9

【사건과의 관계】

출원인

【대리인】

【성명】

이덕록

【대리인코드】

9-1998-000461-7

【포괄위임등록번호】

2000-057146-2

【사건의 표시】

【출원번호】

10-2002-0061994

【출원일자】

2002.10.11

【심사청구일자】

2002.10.11

【발명의 명칭】

6- 메틸피리딘 유도체, 그 제조방법 및 이를 포함하는 항바이 러스용 약학적 조성물

【제출원인】

【접수번호】

1-1-02-0334136-51

【접수일자】

2002.10.11

【보정할 서류】

명세서등

【보정할 사항】

【보정대상항목】

별지와 같음

【보정방법】

별지와 같음

【보정내용】 별지와 같음

【취지】

특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다. 대리인 이덕록 (인)

1020020061994

출력 일자: 2003/10/4

【수수료】

【보정료】 0 원

【추가심사청구료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 0 원

【보정대상항목】 발명(고안)의 명칭

【보정방법】 정정

【보정내용】

6-메틸피리딘 유도체, 그 제조방법 및 이를 포함하는 항바이러스용 약학적 조성물
{6-METHYLPYRIDINE DERIVATIVE, METHOD FOR PREPARING THEREOF AND ANTIVIRAL
PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING THE SAME}

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0001
【제출일자】	2002. 10. 11
【발명의 명칭】	6- 메틸피리딘 유도체, 그 제조방법 및 이를 포함하는 항바이러스용 약학적 조성물
【발명의 영문명칭】	6-Methylpyridine derivatives, its preparation and antiviral pharmaceutical composition comprising the same
【출원인】	
【명칭】	(주)비엔씨바이오팜
【출원인코드】	1-2000-046587-9
【대리인】	
【성명】	이덕록
【대리인코드】	9-1998-000461-7
【포괄위임등록번호】	2000-057146-2
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김종우
【성명의 영문표기】	KIM, Jong Woo
【주민등록번호】	610804-1389917
【우편번호】	431-050
【주소】	경기도 안양시 동안구 비산동 245 삼호뉴타운아파트 9동 908호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상욱
【성명의 영문표기】	LEE, Sang Wook
【주민등록번호】	540115-1168929
【우편번호】	430-030
【주소】	경기도 안양시 만안구 박달동 149-1 금호아파트 104동 302호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이근형
【성명의 영문표기】	LEE, Geun Hyung

【주민등록번호】	710605-1519920
【우편번호】	449-863
【주소】	경기도 용인시 백암면 고안리 557-1 생활관아파트 304호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	한재진
【성명의 영문표기】	HAN, Jae Jin
【주민등록번호】	650920-1067631
【우편번호】	430-712
【주소】	경기도 안양시 만안구 안양2동 70 대우아파트 102동 807호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박상진
【성명의 영문표기】	PARK, Sang Jin
【주민등록번호】	710321-1117424
【우편번호】	134-021
【주소】	서울특별시 강동구 천호1동 금호아파트 316호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박을용
【성명의 영문표기】	PARK, Eul Yong
【주민등록번호】	711115-1057233
【우편번호】	430-017
【주소】	경기도 안양시 만안구 안양7동 화남아파트 2차 502호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	신중철
【성명의 영문표기】	SHIN, Joong Chul
【주민등록번호】	740220-1927211
【우편번호】	449-863
【주소】	경기도 용인시 백암면 고안리 557-1 생활관아파트 304호
【국적】	KR
【심사청구】	청구

【책지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
이덕록 (인)

【수수료】

【표】

19 면 29,000 원

【표】

0 면 0 원

【표】 장료】

0 건 0 원

【표】

3 항 205,000 원

234,000 원

소기업 (70%감면)

【표】 수수료】

70,200 원

【표】 서류】

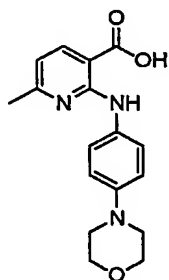
1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 소기업임을 증명하는 서류[사업자
등록증, 원천징수이행상황신고서]_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 항바이러스제로 유용한 6-메틸피리딘 유도체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus ; HCV)의 증식억제 효과가 뛰어난 하기 화학식 1 로 표시되는 신규의 6-메틸피리딘 유도체 및 그의 약학적으로 허용되는 염, 그의 제조방법과 상기 화합물을 유효성분으로 하는 항바이러스용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 의한 화학식 1 로 표시되는 신규의 6-메틸피리딘 유도체는, C형 간염 바이러스(HCV)의 증식을 억제하는 효과가 우수하고 독성도 적으므로, C형 간염의 예방과 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

[화학식 1]



【색인어】

항바이러스제, 6-메틸피리딘 유도체, C형 간염 바이러스

【명세서】

【발명의 명칭】

6-메틸피리딘 유도체, 그 제조방법 및 이를 포함하는 항바이러스용 약학적 조성물
 {6-Methylpyridine derivatives, its preparation and antiviral pharmaceutical composition
 comprising the same}

【발명의 상세한 설명】

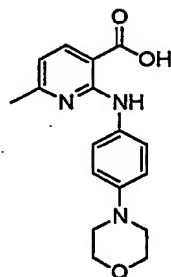
【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<1> 본 발명은 항바이러스제로 유용한 6-메틸피리딘 유도체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus ; HCV)의 증식억제 효과가 뛰어난 하기 화학식 1로 표시되는 신규의 6-메틸피리딘 유도체 및 그의 약학적으로 허용되는 염, 그의 제조방법과 상기 화합물을 유효성분으로 하는 항바이러스용 약학적 조성물에 관한 것이다.

<2> [화학식 1]

<3>



<4> C형 간염 바이러스 (Hepatitis C virus, HCV: 이하 "HCV"라 함)는 비 A형, 비 B형 간염 (non-A, non-B viral hepatitis)의 주 인자로서, 주로 수혈 및 지역 특이적 감염

(community-acquired)에 의해 일어난다. HCV 에 감염되면, 그 징후가 나타나는 경우 약 80%는 만성 감염으로 진행되고 약 20% 정도가 간경화를 일으키는 급성 감염으로 진행돼 간암으로 전이된다. 최근의 보고에 의하면, 전 세계적으로 약 2억 명 이상이 HCV에 감염되어있으며 미국 내에서도 4백50만 명 이상으로 추정되며 (최대 천오백만 명 까지 될 것으로 추정됨) 유럽에서만도 5백만 명 이상이 HCV 환자인 것으로 알려져 있다.

- ⑤ HCV는 HBV 와는 다른 플라비바이러스 (Flavivirus) 과에 속하는 막을 가진 바이러스이다. 막 내에 약 9.5kb 크기의 (+)-RNA (single stranded positive-sense RNA)를 게놈으로 가지며, RNA 게놈은 5' 말단과 3' 말단의 비해석 부분과 하나의 긴 open reading frame (ORF) 으로 구성되어 있다. 이 ORF는 숙주세포의 효소에 의해 3,010 내지 3,040 개의 아미노산으로 이루어진 폴리프로테인 (polyprotein) 으로 발현되며, 숙주 세포와 바이러스 자신의 효소 (protease)에 의해 3가지의 구조 단백질 (structural protein)과 6 가지의 비구조 단백질 (nonstructural protein) 로 나뉜다. 게놈의 5' 말단과 3' 말단 부위에는 각각 동일하게 보존된 부분 (conserved region)이 존재하는데, 이 부분이 바이러스의 단백질 형성과 RNA 복제에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

- ⑥ 하나의 긴 ORF는 폴리프로테인으로 발현되며, 전사 단계 혹은 전사 후 과정 (posttranslational processing)을 통해 구조 단백질인 중심항원 단백질 (core),

표면항원 단백질 (E1, E2); 그리고 비구조 단백질인 NS2 (단백질 분해효소, protease), NS3 (세린계 단백질분해효소 serine protease, 헬리케이스 helicase), NS4A (보조인자 serine protease cofactor), NS4B (protease cofactor, resistance 관련), NS5A, NS5B (RNA 중합효소 RdRp, RNA dependent RNA polymerase) 등으로 나뉘어 각각 바이러스 증식에 작용하게 된다. 구조 단백질의 경우 숙주세포의 신호 펩티드 분해효소 (signal peptidase)에 의해 core, E1, E2의 부분으로 나뉘며, 비구조 단백질의 경우 바이러스 자신의 세린 단백질 분해효소 (serine protease, NS3)와 보조인자 (cofactor, NS2, NS4A, NS4B)에 의해 분리된다. 구조 단백질의 중심항원 단백질은 표면항원 단백질과 함께 바이러스의 캡시드 (capsid)를 구성하게 되며, NS3와 NS5B 등의 비구조 단백질은 바이러스 RNA의 복제 (replication)에 중요한 역할을 하게 된다 (참조: Bartenschager, R., 1997, Molecular targets in inhibition of hepatitis C virus replication, Antivir. Chem. Chemother. 8: 281-301).

- 7> 바이러스 RNA의 5'과 3' 말단 부위에는 다른 플라비바이러스와 마찬가지로 동일하게 보존된 비해석부분 (untranslational region, UTR)이 존재하며, 이 부분은 바이러스의 증식에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 5' 말단에는 341 개의 뉴클레오타이드로 구성된 5'-UTR이 존재하는데, 이 부분은 4개의 stem and loop (I, II, III, IV) 구조로 이루어져있으며, 이 때문에 단백질 발현을 위한 전사 (translation) 과정에 필요한 리보솜 작용 개시 부위 (internal ribosome entry site, IRES)로서 작용한다. 특히, 가장 크고 안정된 구조를 가지며 보존된 염기서열 (conserved sequence)이 존재하는 stem III가 리보솜 부착에 가장 필수적인 부분으로 보고 되었다. 그리고, stem IV의 단일 RNA 부분에 존재하는 AUG로부터 전사 과정이 개시되어 바이러스의 단백질이 발현되는 것으로 알려져 있다 (참조: Stanley, M. Lemon and Masao

Honda, 1997, Internal ribosome entry sites within the RNA genomes of hepatitis C virus and other Flaviviruses, seminars in Virology 8:274-288).

- 8> 또한, 3' 말단에는 318 개의 뉴클레오타이드로 구성된 3'-UTR이 존재하는데, RNA 복제에 필수적인 효소인 NS5B의 부착 (binding)이 시작되는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이 부분은 염기 서열과 3차원적 구조에 따라 3가지의 다른 부분으로 나눌 수 있다. 즉, 5' 말단에서부터 98 뉴클레오타이드 (98nt.)로 구성된 X-tail-5' 부분과 연속적으로 UTP가 존재하는 -poly(U)- 부분, 그리고, 3'-UTR-의 세 부분으로 나누어진다. X-tail-5' 은 매우 보존된 염기 서열을 갖는 98 개의 뉴클레오타이드로 구성되어 있고, 3 개의 stem and loop 구조로 이루어져 안정적인 3차원적 구조를 가지므로 NS5B의 부착에 필수적인 부분으로 생각되어 진다. 또한, -poly(U)- 부분은 피리미딘 계열을 유도 (pyrimidine track)하여 RNA 중합효소의 작용을 용이하게 하는 것으로 보고 되었다. 그리고, 3'-UTR 부분은 loop의 3차원 구조를 가져 NS5B 의 부착에 중요한 역할을 하지만 그 구조가 안정적이지는 않다. 이러한 3' 말단 부위는 RNA 복제가 시작될 때 NS5B 의 부착에 필수적인 구조를 이루는 것으로 알려져 있다 (참조: Yamada *et al.*, 1996, Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus genome, Virology 223:255-281).
- 9> HCV의 다양한 효소들 중에서 NS5B 는 RNA 복제에 직접 작용하므로 매우 중요하다. NS5B는 591개의 아미노산으로 이루어져 있으며 65kDa의 분자량을 갖는 효소이다. 아미노산 서열에 따라 1a와 1b를 비롯한 6 개의 유전형으로 나눌 수 있으며 RNA 중합반응과 터미널트랜스퍼레이즈 (terminal transferase)의 활성을 갖는 것으로 보고 되었다. NS5B 효소 내에는 반응에 필요한 RNA의 부착에 필수적인 RBD (RNA-binding domain) 1, 2 의 두 부분의 영역이 존재한다. RBD1은 아미노산 83에서 194 번 사이에 존재하며, RBD2는 아미노산 196에서 298 번 사이에 존재한다.

부족한 활성에 필수적으로 존재하는 (essential motif) 아미노산은 220번 asp, 283번 gly, 317번 gly, 318번 asp, 319번 asp, 346번 lys 등이다. 또한, 이 효소는 바이러스 자신의 RNA (template)이 존재할 때 다른 프라이머 (primer) 없이도 중합반응을 진행할 수 있다 (참조: Lohmann, V. *et al.*, 1997, Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for activity, J. virol. 71:8416-8428).

1989년 클로닝 (molecular cloning)에 의해 RNA 게놈 (genome)이 분리되었다 (Choo, Q-L, *et al.*, 1989, Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 244:359-362). 그 이후로 HCV에 대한 분자 생물학적 연구가 진행되어 왔지만 효과적인 cell culture system과 animal model의 부족으로 인해 제약이 있었다. 그러나 최근 안정하게 HCV의 replication을 할 수 있는 hepatoma cell line이 개발되어 이러한 문제들을 다소나마 해결할 수 있게 되었다 (참조: Lohmann, V., F. Korner, J-O Koch, U. Herian, L. Theilmann, R. Bartenschlager, 1999, Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. Science 285:110-113).

- 11> 현재까지 HCV에 대한 탁월한 백신이나 효과적인 치료제는 존재하지 않는다. 따라서 세계의 많은 제약회사와 연구소에서 HCV 치료제를 개발하고 있다. HCV는 HBV와 비교하여 전 세계적으로 고른 분포를 보이고 있으며, 간경화와 간암으로 전이되는 비율이 HBV 보다 월등히 높다. 그리고 만성 간염으로의 진행 비율이 높지만 이러한 감염기작에 대한 연구는 아직도 진행 중이다. 또한, C형 간염은 수혈을 통해서 뿐만 아니라 정맥주사를 통한 약물 사용이나 문신을 하는 것에 의해서도 감염이 가능하지만 주로 직접적인 blood contact에 의해 감염된다. 그러나 아직도 40~50%의 경우 그 감염경로가 이미 알려진 요인들과 관계가 없어 이러한 경로로 HCV에 의

해 간염이 발병하면 대부분의 환자가 만성으로 진행되며 다시 간경변증으로 진행되어 간암으로 발전하는데 큰 연관이 있을 것으로 생각된다. 따라서 효과적인 vaccine과 치료제의 개발이 절실한 상태이다. HCV는 strain간에 그 유전형 (genotype)이 다양하고 돌연변이 (mutation)가 일어나는 경우가 많은데, HCV에 의한 만성간염이 된 경우 유전적 변이형(genetic variants)에 의해 재감염 (reinfection), 동시감염 (coinfection) 등이 일어나기도 한다. 이 때문에 HCV의 효과적인 vaccine 개발은 성공하기가 어려웠다. 치료방법으로 알파 인터페론 (α -interferon)이 사용되고 있으나, HCV의 유전자형에 따라 그 효과도 다양하고 투여를 중단하면 대부분의 경우에 재발되므로 HCV가 복제하지 못하도록 HCV의 특정 단백질에만 결합하는 저해제 (inhibitor)를 개발하는 것이 그 치료방법 중 하나가 될 수 있다. 이러한 연구에서 가장 좋은 표적은 HCV의 NS3 단백질 분해효소/ 헬리케이스 와 NS5B RNA 중합효소이다. 이러한 효소는 자신의 증식에는 필수적이지만 숙주 세포에는 불필요하므로 항 HCV 제의 개발에 유용하게 이용되고 있다. 따라서, HCV의 NS5B (RNA dependent RNA polymerase (replicase))는 증식에 필수적인 HCV의 효소이므로 HCV의 성장을 억제하기 위한 치료에 좋은 표적 (target)이 될 수 있을 것이다.

- 2> 현재까지의 연구에서는 백신을 이용한 예방이 어려우며, α -인터페론 (interferon)과 리바비린 (Ribavirin) 을 이용한 치료법이 시행되고 있으나 그 치료율이 낮고 부작용이 나타나므로 그 효과가 미약한 실정이다. 인터페론 요법의 경우 전혀 반응을 보이지 않는 경우가 약 25%이고, 일시적으로 반응하다가 재발하는 경우가 약 25% 정도이다. 나머지 약 50%의 환자에서는 치료 종료 후까지 에이엘티 (ALT)치가 정상으로 유지되고 HCV RNA가 음성이 되는데 그 중 50% 정도는 치료 종료 후 3-6개월 내에 재발하므로 결국 25% 정도에서만 6개월 이상 치료효과가 유지되는 지속적 반응(sustained response)을 보이는 셈이다. 또한, C형 간염 바이러스에는 6가지

유전자형(subtype)이 존재하는데 우리나라에 가장 많은 1b형은 2, 3형에 비해 인터페론 치료에 좋은 반응을 보이지 않는다. 이러한 이유로 리바비린과의 병용요법을 사용하게 되었는데 이 경우 치료 효과가 2 배정도 높아지는 것으로 나타났으나, 리바비린 만을 단독으로 사용하는 경우에는 효과가 거의 없고 적혈구가 파괴되어 빈혈 등의 부작용이 나타나므로, 주로 인터페론 치료에 반응이 없거나 재발한 경우에 처방하는 것으로 알려져 있다. 따라서 지금까지는 HCV에 특이적으로 작용하여 증식을 억제함으로써 C 형 간염을 치료하는 항바이러스제는 개발되지 못한 상태이다.

- 3> 이에 본 발명은 재조합 (recombinant) 발현 된 HCV RNA 중합효소 (NS5B, RNA polymerase)의 활성을 저해하는 물질을 탐색함으로써, HCV에 대한 우수한 항바이러스 활성을 나타내고 독성과 부작용이 적은 비핵산계 (non-nucleoside) 화합물을 개발하는 것을 목적으로 하였다.
- 4> 이에 본 발명자들은 부작용 및 독성이 적고 내성 바이러스 출현이 낮은 새로운 C형 간염 치료제의 개발을 목적으로 HCV에 대해 우수한 항바이러스 활성을 나타내는 화합물을 개발하기 위해 노력한 결과, 상기 화학식 1 로 표시되는 신규의 6-메틸피리딘 유도체를 합성하였으며 이 물질이 HCV의 증식 억제 효과가 우수함을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

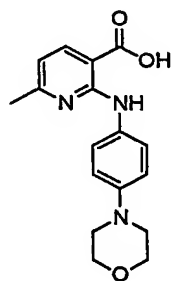
- 5> 본 발명의 목적은 새로운 6-메틸피리딘 유도체와 약학적으로 허용되는 그의 염 및 그의 제조 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 유효성분으로 하며 부작용이 적고 경제적인, C형 간염의 치료 및 예방을 위한 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

16> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 하기 화학식 1 로 표시되는 새로운 6-메틸피리딘 유도체 및 약학적으로 허용되는 그의 염을 제공한다.

17> [화학식 1]

18>

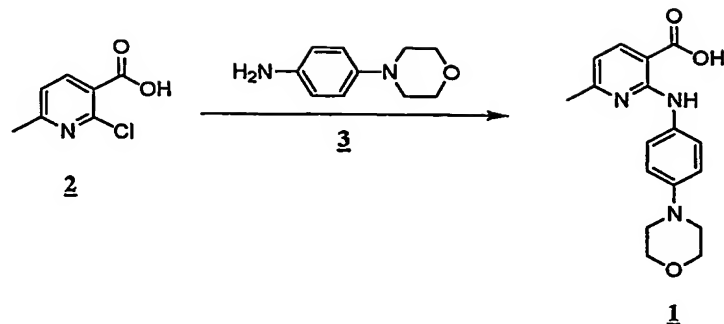


9> 본 발명의 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 화학식 1의 화합물은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 약제학적으로 허용되는 산 부가염을 형성할 수 있다. 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산(Citric acid), 초산, 젖산, 주석산(Tartaric acid), 말레인산, 푸마르산(Fumaric acid), 포름산, 프로피온산(Propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔설폰산, 글루탐산 또는 아스파르트산 등을 사용할 수 있다.

0> 또한 본 발명에서는 하기 반응식 1 로 표시되는 화학식 1의 6-메틸피리딘 유도체의 제조방법을 제공한다.

21> [반응식 1]

22>



3> 본 발명의 제조방법은, 상기 반응식 1에서 표시된 바와 같이, 상기 화학식 2의 2-클로로-6-메틸니코틴산 과 상기 화학식 3의 4-(4-모르포리노)아닐린 을 반응시켜서 화학식 1의 6-메틸피리딘 유도체를 제조한다. 상기 반응식 1에서 출발물질 및 반응물질로 사용되는 화학식 2의 2-클로로-6-메틸니코틴산 과 화학식 3의 4-(4-모르포리노)아닐린 등은 상업적으로 시판되는 물질로서 용이하게 구입하여 사용할 수 있다.

4> 상기 반응식 1의 제조방법을 좀 더 구체적으로 설명하면, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 디클로로메탄, 클로로포름, 아세토니트릴, *N,N*-디메틸포름아미드, 아세톤, 등과 같은 유기용매 내에서, 피리딘, 2,6-루티딘, 4-디메틸아미노피리딘, *N,N*-디메틸아닐린 등과 같은 염기성이 약한 일반적인 삼급 유기염기 존재하에 반응시키는 것이 바람직하며, 40℃-80℃의 온도범위 내에서 1 일 내지 6 일의 비교적 긴 반응시간 동안에 서서히 잘 진행된다.

5> 또한 본 발명에서는 화학식 1의 6-메틸피리딘 유도체 및/또는 약학적으로 허용되는 그의 염을 유효성분으로 포함하는, C형 간염의 치료제 또는 예방제용 약학적 조성물을 제공한다.

6> 본 발명의 화학식 1의 화합물은 C형 간염의 치료제로서 임상 투여시에, 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품제제의 형태로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 화학식 1의

화합물은 실제 임상 투여시에 경구 및 비경구(바람직하게는 주사제로)의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화학식 1의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 슈크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜(Polyethylene glycol), 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸 올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

27> 본 발명의 화학식 1의 화합물의 유효용량은 성별, 나이, 환자의 상태 등을 고려하여 적절히 선택될 수 있으나, 일반적으로 성인에게 10 - 1000 mg/일, 바람직하게는 20 - 500 mg/일 이며, 하루에 1 - 3회 분할 투여할 수 있다.

28> 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

29> <실시예 1> 6-메틸-2-[4-(4-모르포리노)아닐리노]니코틴산 의 제조.

100 ml 에 2-클로로-6-메틸니코틴산 5 g 과 4-(4-모르포리노)아닐린 5.45 g , 그리고 피리딘 7.2 ml를 가한 후 가열하여, 60℃에서 5 일 동안 반응시켰다. 반응 완결 후 실온에서 반응 도중에 석출된 소량의 고체를 여과하고 클로로포름 10 ml 로 세척하여 불어냈다. 용매인 클로로포름을 감압농축하고 메탄올 60 ml 로 결정화시켜서 1 시간 후, 여과하고 메탄올 10 ml 로 2 회 세척하여 얻어진 결정을 35℃-45℃에서 진공에서 41 g (수율 80 %)의 목적화합물을 얻었다.

mp - 221 °C

32> ¹H-NMR (DMSO-d₆), ppm : δ 2.39(s, 3H), 3.04(t, 4H), 3.73(t, 4H), 6.61(dd, 1H), 6.84(d, 2H), 7.57(dd, 2H), 8.05(dd, 1H), 10.21(s, 1H)

33> <실험예 1 > HCV RNA 중합효소 (RNA 의존형 RNA 중합효소, NS5B)에 대한 생체의

34> (*in vitro*) 저해활성 조사

35> 본 발명의 화합물들의 HCV RNA 의존형 RNA 중합효소에 대한 활성 저해 효과를 알아보기 위하여 다음과 같은 생체의 실험을 실시하였다.

36> 재조합 HCV RNA 중합효소 제조

37> HCV RNA 중합효소는 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 먼저, HCV-1b 형 C 형 간염바이러스 환자의 혈액으로부터 cDNA를 얻어낸 다음 PCR을 이용하여 NS5B (1773bps)부위를 증폭하여 배큘로바이러스 (baculovirus) 전이벡터 pVLHIS에 삽입한 재조합 전이벡터를 제조하였다. 제조

된 전이벡터를 wild-type AcNPV 벡터와 함께 곤충세포 (Sf 9 cell line)에 감염 (cotransfection)시켜 히스티딘 표지 (histidine tag) 된 재조합 벡터 pVLHIS-NS5B를 가진 재조합 배콜로바이러스를 만들었다. 이와 같이 제조된 재조합 배콜로바이러스를 충분히 배양된 곤충세포에 감염 (infection) 하고 10 % FBS 가 첨가된 Grace' medium에서 3-4일 간 배양한 다음 감염된 세포만을 원심분리 하여 얻어내었다. 얻어진 세포를 PBS 로 3차례 세척한 다음 초음파 분해 처리 (sonication)하고 NI-NTA His bind resin (Novagen 사)을 이용한 친화성 (affinity) 컬럼크로마토그래피 과정을 거쳐 순수한 NS5B 단백질을 제조하였다.

38> HCV 3' 말단 (3'-UTR)을 포함하는 RNA 주형 (RNA template) 제조

39> HCV 3'-UTR을 포함하는 RNA 주형은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 먼저 C형 간염환자의 혈액으로부터 얻어진 HCV RNA로부터 PCR 방법을 통해 cDNA를 얻어낸 다음 제한효소 Eco R I 을 이용하여 3'-UTR의 부위를 포함하는 DNA 절편을 얻어내었다. 이 DNA로부터 시험관내 전사 (*in vitro* transcription) 과정을 거쳐 3'-UTR을 포함하는 RNA를 제조하였다.

40> 재조합 HCV RNA 중합효소에 대한 본 발명의 화합물들의 생체의 저해활성 측정

41> 본 발명에 사용된 HCV RNA 중합효소에 대한 본 발명의 화합물들의 생체의 저해활성 측정 방법은 다음과 같다. 측정하고자 하는 시료에 맞게 스트렙타비딘 (streptavidin)으로 코팅된 웰 (well)을 준비하고, 먼저, 각 웰에 2X 반응 완충액 [50mM Tris-Cl (pH 7.5), 100mM NaCl,

10mM MgCl₂ , 20mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT]을 25 μ l 씩 가하고, 분리정제 된 HCV RNA 중합효소 200ng을 10 μ l 씩 가한 후, 측정하고자 하는 시험 물질을 최종 농도가 각각 10, 1, 0.1, 0.01 μ g/ml 이 되도록 하여 5 μ l 씩 첨가한 다음, 마지막으로 RNA 주형인 HCV 3'-UTR RNA와 반응을 위한 뉴클레오타이드 로서 DIG-(digoxigenin)-UTP, biotin-UTP, ATP, CTP, GTP, UTP가 혼합된 반응 혼합액을 10 μ l 씩 가한 다음, 22 $^{\circ}$ C에서 60분 간 반응시켰다. HCV 중합효소의 활성화에 의해 RNA가 만들어지고 여기에는 바이오티인이 붙어있는 UTP가 포함되어 있으므로 새로운 RNA는 웰에 코팅되어 있는 스트렙타비딘과 결합한다. 반응이 끝난 후 반응하지 않고 남아있는 불순물을 제거하기 위해 각 웰 당 200 μ l의 세척 완충액 (washing buffer, pH 7.0, Roche 사)을 가한 다음 3차례 반복하여 씻어 주었다. 그 다음 2차 항체인 항-DIG-POD (peroxidase, Roche 사)를 100 μ l 씩 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 후 다시 세척 완충액으로 각 웰을 씻어 주었다. 마지막으로 POD의 기질인 ABTS^R (Roche 사)를 각각 100 μ l씩 가하여 15-30 분간 반응시킨 다음 ELISA 판독기 (Bio-Tek instrument 사)를 이용하여 405nm에서 흡광도 (OD 값)를 측정하였다. 이때 시료를 넣지 않은 대조군 (positive control)과의 상대적인 흡광도 차이에 따라 HCV 중합효소에 대한 활성 억제 효과를 계산하였다. 그 결과를 다음 표 1에 나타내었다.

12> [표 1]

13>

시험화합물	HCV RNA중합효소의 활성저해율 (%)			
	10 μ g/ml	1 μ g/ml	0.1 μ g/ml	0.01 μ g/ml
실시예 1	99	82	65	46

44> 이와 같이 본 발명의 화합물들은 HCV 의 복제에 중요한 역할을 하는 HCV RNA 중합효소의 활성을 저해하는 효과가 우수하므로 이를 기전으로 HCV 의 증식을 억제할 수 있으며, 따라서 C형 간염의 예방제 및 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

45> <실험예 2> 세포독성 실험

46> 화학식 1의 화합물들이 세포독성(Cytotoxicity)을 나타내는지 알아보기 위하여, Hép G2 세포를 이용하여 일반적으로 널리 알려진 MTT 분석방법으로 시험관내(*in vitro*)실험을 실시하였다. 그 결과, 실험에 사용된 화합물들은 모두 CC_{50} 값이 $100 \mu\text{g/ml}$ 이상으로서, 세포에 대한 독성이 매우 적은 물질인 것으로 판명되었다.

【발명의 효과】

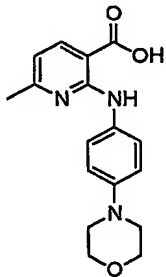
47> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의한 상기 화학식 1로 표시되는 신규의 6-메틸피리딘 유도체는, C형 간염 바이러스 (HCV)의 증식을 억제하는 효과가 우수하고 독성도 적으므로, C형 간염의 예방제 및 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하기 화학식 1로 표시되는 6-메틸피리딘 유도체 및 약학적으로 허용되는 그의 염:

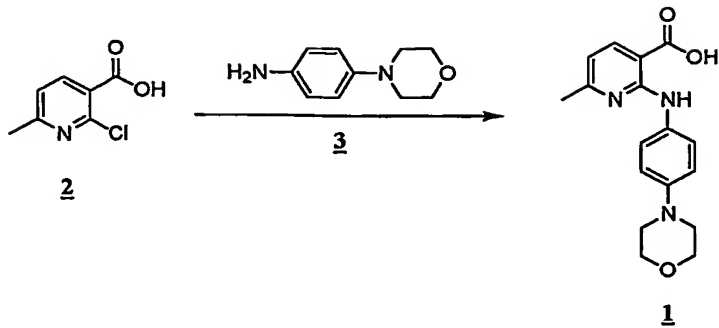
[화학식 1]



【청구항 2】

하기 반응식 1에 나타내는 바와 같이, 화학식 2의 2-클로로-6-메틸니코틴산 과 화학식 3의 4-(4-모르포리노)아닐린 을 반응시켜서 화학식 1의 6-메틸피리딘 유도체를 제조하는, 제 1 항의 6-메틸피리딘 유도체의 제조방법.

[반응식 1]



【청구항 3】

하기 화학식 1로 표시되는 6-메틸피리딘 유도체 및 약학적으로 허용되는 그의 염을 유효성분으로 함유하는 C형 간염의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

[화학식 1]

